

AVALIAÇÃO DO DETERMINANTE GENÉTICO DA RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE BACTÉRIAS LÁCTICAS

VITOR W. M. VIRGINIO¹, PATRÍCIA B. ZACARCHENCO², IZILDINHA MORENO³, ELZA T. GRAEL MARASCA⁴, FABIANA K. H. S. TRENTTO⁴, RENATA BROMBERG⁴

Nº10232

Resumo

Os critérios de seleção de linhagens com potencial probiótico incluem ausência de propriedades indesejadas como fatores de virulência, atividade bioquímica prejudicial e transmissão de resistência a antibióticos. O presente trabalho objetivou determinar se a resistência a antibióticos das culturas *Lactobacillus plantarum* CTC-368, *Enterococcus avium* CTC-469 e *Enterococcus avium* CTC-483 isoladas de produtos cárneos é cromossômica ou plasmidial, usando a cura com acridina laranja. A resistência a vancomicina dos isolados mutantes e não mutantes foi a mesma. Também os perfis de bandas em géis de eletroforese dos extratos de DNA plasmidial destes dois grupos foram similares. Estes resultados indicam que a resistência ao antibiótico pode ser cromossômica. Esta pesquisa contribuiu para verificar o potencial probiótico destas culturas na aplicação industrial em produtos cárneos, já que a resistência aos antibióticos parece ser cromossômica, ao invés de plasmidial.

Palavras chaves: probiótico, bactérias lácticas, antibióticos, cura, plasmídeos

Abstract

Among the criteria to select bacteria for probiotic use are the absence of virulence factors and no transfer of antibiotic resistance. This article intended to verify if the antibiotic resistance of the cultures *Lactobacillus plantarum* CTC-368, *Enterococcus avium* CTC-469 and *Enterococcus avium* CTC-483 isolated from meat products is determined by plasmid or cromossomes. The technique used was plasmid curing by orange acridine. The antibiotic resistance of the cultures cited above and isolated after this curing were the same. Also the band profiles of eletrophoresis gels of both these cultures were similar. These results indicated that the antibiotic resistance is probably determined by cromossomes. The present study verified one of the characteristics of probiotics potencial to apply in the meat industry.

Key words: probiotic, lactic acid bacteria, antibiotics, cure, plasmids

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Biologia, PUC, Campinas-SP, vitorwilson@hotmail.com

² Orientador: Pesquisador, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP, pblumer@ital.sp.gov.br

³ Co-orientador: Pesquisador, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP

⁴ Colaborador: Pesquisador, TECNOLAT/ITAL, Campinas-SP

Introdução

O estudo de resistência das BAL (bactérias lácticas) aos antibióticos é importante devido ao seu uso em alimentos e como probióticos para reconstituição da microbiota intestinal em tratamentos com antimicrobianos (GONÇALVES, 2009). A possibilidade de transmissão dos genes de resistência de BAL tolerantes a determinados antibióticos para microrganismos patogênicos ou potencialmente patogênicos é uma preocupação na seleção e segurança das espécies com ação probiótica utilizadas como fermento (DANIELSEN, WIND, 2003).

Para um microorganismo probiótico garantir efetividade, várias condições devem ser atendidas: não apresentar variação genética, apresentar resistência a acidez estomacal e a sais biliares, ser capaz de proliferar e sobreviver no intestino, produzir determinados metabólitos, fazer imunomodulação, ser seguro ou *Generally Regarded as Safe* (GRAS). As bactérias probióticas devem, ainda, ser resistentes a tratamentos com antibióticos no organismo do hospedeiro (MARAGKOUidakis et al, 2006; GIBSON, FULLER, 2000 citado por HAULY et al, 2005).

A evolução da resistência a antibióticos em populações de microrganismos é aumentada pela transferência horizontal de genes móveis entre espécies e gêneros por meio de plasmídeos, transposons e bacteriófagos (KHACHATRYAN et al., 2004). Esses genes também podem estar no próprio cromossomo (AMINOV et al., 2001). Plasmídeos são pequenas moléculas de fita dupla de DNA, contendo os elementos necessários para a sua replicação e pelo menos um gene que confere resistência a antibiótico (NASCIMENTO et al., 2003).

Para provocar a eliminação do DNA – plasmidial, o que é importante para estudos de resistência a antibióticos, se aplica agentes mutagênicos. Dentre estes agentes estão os corantes de acridina, brometo de etídio, rifampicina, sal de bis-amônio e mais, recentemente, a tioridazina, uma fenotiazina, e antibióticos inibidores da subunidade B da DNA girase, novobiocina e coumermicina (FU et al. 1988, RADHAKRISHNAN et al. 1999). O presente trabalho objetivou determinar se a resistência antimicrobiana nos microrganismos estudados é cromossômica ou plasmidial, contribuindo para a verificação do potencial probiótico para aplicação industrial em produtos cárneos.

Material e Métodos

As bactérias lácticas utilizadas neste estudo foram *Lactobacillus plantarum* CTC-368, isolado de lingüiça de javali, *Enterococcus avium* CTC-469, isolado de CMS (carne mecanicamente separada) e *Enterococcus avium* CTC-483, isolado de fígado de frango). Foi utilizado para estudo de perfil de plasmídeo o protocolo de extração de

DNA plasmidial em larga escala de Birboim, Doly (1979), metodologias de concentração e replicação de plasmídeo (SAMBROOK *et al*, 1989) e de estimativa de concentração plasmidial (MANIATIS, 1982). Para a determinação da localização dos genes que codificam a resistência aos antibióticos foi utilizada cura com acridina laranja, visando à perda de plasmídeo (PULGAR, 2006). Foram realizados dois testes de cura com acridina. A cultura *Lactococcus lactis* + pXy/T:SEC: quimosina b (LLP) contendo plasmídeo foi também tratada com acridina para verificar perda de plasmídeos. A separação dos plasmídeos foi realizado por eletroforese em gel de agarose 0,8%, em tampão TBE pH 8,0 (Tris-base 89mM, ácido bórico 89mM, EDTA 2mM) a 80 volts por aproximadamente 1 hora. Após corar os géis com brometo de etídio à concentração final de 5µg/mL, a visualização do perfil dos plasmídeos foi realizada em foto documentador Image Master VDS (Pharmacia – USA) com auxílio de luz ultravioleta.

Para verificação de mutação foram utilizadas duas técnicas que avaliaram a permanência ou não da resistência ao antimicrobiano vancomicina (0,33mg/ml) pelos isolados mutantes. Uma das metodologias consistiu em medir e comparar a formação de halos de inibição seguindo o modo descrito em TODOROV *et al* (2008). Na outra técnica se fez o isolamento e transferência de 155 colônias de cada cultura para meio de cultura com e sem antibiótico. Para ambos os ensaios utilizou-se o antimicrobiano vancomicina na concentração de 0,33mg/ml. As culturas aqui estudadas foram selecionadas por ensaios de resistência a oito antibióticos. Três delas se destacaram por suas maiores resistência aos antibióticos avaliados. Essas culturas apresentaram, em ensaios anteriores, as mesmas bandas e mesma resistência ao antibiótico vancomicina

Resultados e Discussão

Nos dois tratamentos de cura de plasmídeo com acridina laranja todos os tubos com o corante e microorganismos apresentaram crescimento. De acordo com Pulgar (2006), utilizou-se para obtenção dos extratos de DNA plasmidial e para verificação da manutenção ou perda da resistência a vancomicina as culturas tratadas na maior concentração de acridina laranja. Cinco colônias de cada cultura mutada no primeiro tratamento com acridina foram avaliadas para verificação da mutação por comparação e medição da formação de halos de inibição. Não houve a formação de halos de inibição de crescimento nas culturas mutadas e nas não tratadas com acridina CTC-368, CTC-469 (**figura 3**) e CTC-483. Apenas na amostra sensível ao antibiótico CTC-204, usada como controle, apareceram halos de inibição como mostra a **figura 4**. Na verificação de mutação por isolamento e transferência 155 colônias isoladas de uma

das culturas originais, após segundo tratamento com acridina, permaneceram resistentes ao antimicrobiano vancomicina apresentando igual crescimento nas placas com e sem antibiótico.

A eletroforese dos extratos de DNA plasmidial das culturas mutantes tratadas com acridina laranja e das não mutantes podem ser visualizadas nas **figuras 1 e 2**. As bandas de DNA plasmidial apareceram similares tanto nas mutantes quanto nas não mutantes que foram usadas para comparação. Estes resultados significam que as culturas antes e após o tratamento com acridina apresentaram a mesma resistência a vancomicina indicando que essa resistência pode estar relacionada a genes cromossomais. Embora muitos autores como Costa (1987) coloquem que a resistência aos antibióticos seja plasmidial, Araújo et al (2009) destacaram que as resistências a tetraciclina e eritromicina das bactérias que estudaram podem estar relacionadas a genes cromossomais.

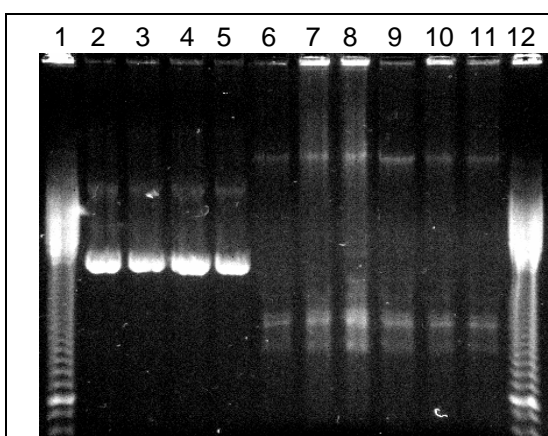


FIGURA 1. Perfil de plasmídeos das bactérias lácticas estudadas tratadas com acridina laranja (1- Marcador de peso molecular - 100pb, 2- *Lactococcus lactis* + pXy/T:SEC: quimosina b NCDO 2118 (LLP), 3- (LLP)v1, 4- (LLP)v2, 5- (LLP)v3, 6- CTC-368, 7- 368v1, 8- 368v2, 9- 368v3, 10- 368v4, 11- 368v5, 12- Marcador de peso molecular - 100pb)

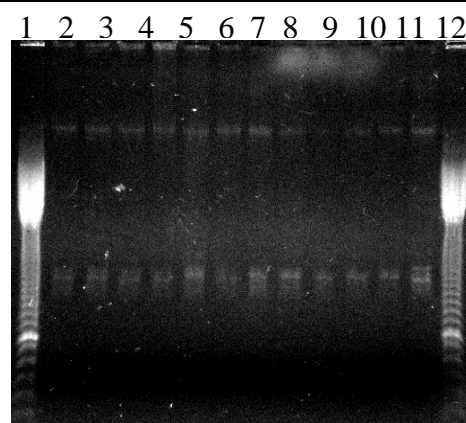


FIGURA 2. Perfil de plasmídeos das bactérias lácticas estudadas tratadas com acridina laranja (1- Marcador de peso molecular - 100pb, 2- CTC-469, 3- 469v1, 4- 469v2, 5- 469v3, 6- 469v4, 7- 469v5, 8- CTC-483, 9- 483v1, 10- 483v2, 11- 483v3, 12- 483v4, 13- 483v5, 14- Marcador de peso molecular - 100pb)

Conclusões

Na busca para verificar se a resistência aos antibióticos das culturas *Lactobacillus plantarum* CTC-368, *Enterococcus avium* CTC-469 e *Enterococcus avium* CTC-483 é codificada por genes presentes no DNA cromossomal ou plasmidial se adaptou etapas de protocolos de extração de plasmídeos e se avaliou metodologias de cura. Após os tratamentos de cura os isolados permaneceram com resistência ao antibiótico vancomicina. Isto indica que a resistência a antibióticos das bactérias

estudadas pode ser cromossômica. Esta pesquisa contribuiu com a verificação do possível potencial probiótico das linhagens em estudo, já que a resistência à antibióticos parece ser determinada por cromossomos, ao invés de plasmídeos. Desenvolveu-se aqui mais uma etapa no estudo de características que as colocam entre aquelas com potencial probiótico para aplicação industrial em produtos cárneo.

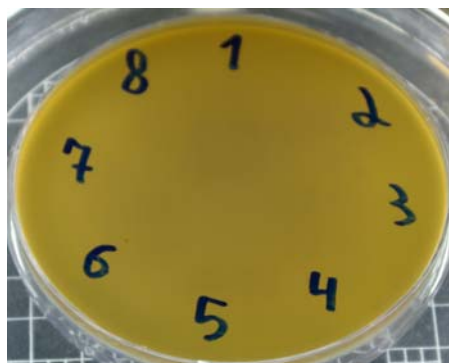


FIGURA 3. Comparação e medição da formação de halos de inibição. (CTC-469, resistente a maior concentração de vancomicina (0,33mg/ml), assim como a CTC-368 e CTC-483)

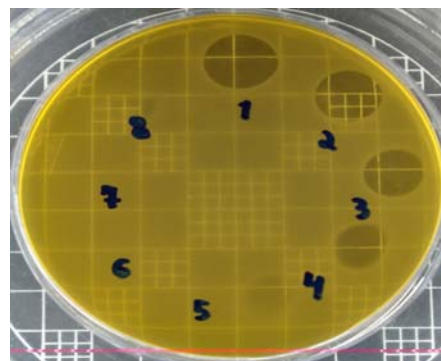


FIGURA 4. Comparação e medição da formação de halos de inibição. (CTC-204, usada como cultura sensível a vancomicina)

Agradecimentos

Ao CNPq pela Bolsa PIBIC concedida e a FAPESP pelo auxílio financeiro ao projeto.

Referências Bibliográficas

- AMINOV, R.I.; GARRIGUES-JEANJEAN, N.; MACKIE, R.I. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation o primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribossomal protection proteins. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.,67, p.22-32, 2001.
- BIRNBOIM, H.C., DOLY, L.. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acid Research**. 7: 1513-23, 1979
- DANIELSEN, M.; WIND, A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. **Int. J. Food Microbiol**, 82, 1 –11.
- FU, K.P.; GRACE, M.E.; HSIAO, C.L.; HUNG, P.P. 1988. Elimination of antibiotic-resistant plasmids by quinolone antibiotics. **Chemother**. 34:415-418.
- GONÇALVES, S.M.L. Identificação e caracterização de bactérias do ácido láctico isoladas de um produto cárneo fermentado tradicional e do ambiente fabril. Universidade Técnica de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária. Lisboa, 2009

HAULY, M.C.O.; FUCHS, R.H.B.; PRUDENCIO-FERREIRA, S.H. Suplementação de iogurte de soja com frutooligossacarídeos: características probióticas e aceitabilidade.

Revista de Nutrição, v. 8, n. 5, p.613-622, 2005

KHACHATRYAN, A.R.; HANCOCK, D.D.; BESSER, T.E. et al. Role of calf-adapted *Escherichia coli* in maintenance of antimicrobial drug resistance in dairy calves. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.70, p.752-757, 2004.

MARAGKOUidakis, P.A.; ZOUMPOPOULOU, G.; MIARIS, C.; KALANTZOPOULOS, G.; POT, B.; TSAKALIDOU, E. Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal* 16 (2006) 189–199

MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. and SAMBROOK, J., *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982).

NASCIMENTO, A.A.C., ESPREAFICO, E.M., LARSON, M.L.P., MONESI, N., ROSSI, N.M.M., RODRIGUES, V. Tecnologia do DNA Recombinante. **Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina**, Ribeirão Preto 2003.

PULGAR, A. M. P. Optimización de la producción de la enterocina as-48 y ensayo de su eficacia como bioconservante en alimentos, **Universidad de Granada Facultad de Ciencias Departamento de Microbiología**, Granada 2006.

RADHAKRISHNAN, V.; GANGULY, K.; GANGULY, M.; DATIDAR, S.G.; CHAKRABARTY, A.N. 1999. Potentiality of tricyclic compound thioridazine as an effective antibacterial and antiplasmid agent. **J. Exp. Biol.** 37:671-675.

SAMBROOK, J; MANIATIS, T E ; FRITSCH, F. *Molecular cloning: a laboratory manual*. **New York: Cold Spring Harbor laboratory**, 1989

TODOROV, S.D.; BOTES, M.; GUIGAS, C.; SCHILLINGER, U.; WIID, I.; WACHSMAN, M.B.; HOLZAPPFEL, W.H. Boza a natural source of probiotic lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 465-477, 2008.